



(2,000円)

# 特 許 願

優先権主張

国名 アメリカ合衆国

日付 1973年7月20日

番号 381,191

昭和49年7月20日

特許庁長官 殿

## 1. 発明の名称

ヒスチジン  
非免疫性ポリペプチド類の製造法

## 2. 発明者

住所 アメリカ合衆国ニュージャージー州08816  
イーストブランチスウィック市フアーミングデール  
ロード19番地  
氏名 フランク・エフ・ゲービス (ほか2名)

## 3. 特許出願人

住所 アメリカ合衆国ニュージャージー州10017  
ニュージャージー市レキシントンアベニュー405番地  
名称 リサーチ・コーポレーション  
代表者 ウィラード・マーシイ  
国籍 アメリカ合衆国

## 4. 代理人

〒541  
住所 大阪府大阪市東区本町2-10 本町ビル内  
電話 大阪 (06) 262-5521  
氏名 弁理士 (6214) 青山 保 (ほか1名)

49-06373.1

方式  
登録

## 明 細 書

### 1. 発明の名称

非免疫性ポリペプチド類の製造法

### 2. 特許請求の範囲

1. 単量体当り2または3の炭素原子を有し、ヒドロキシ基または5より少い炭素原子を有するアルコキシ基または5より少い炭素原子を有するアルキル基で置換されまたは置換されていない直鎖ポリアルキルまたは直鎖ポリアルコキシ重合体の少くとも1つの末端炭素原子を、カップリング剤と反応させて末端基をポリペプチド類と反応性に活性化し、ポリペプチド1モル当り100~1000モルの割合にそのポリペプチドと反応させることを特徴とする本来免疫性と生理活性を有するポリペプチドの非免疫性、生理活性、水溶性ポリペプチド配合体の製造法。

### 3. 発明の詳細な説明

本発明はポリペプチド類、特にポリペプチドが哺乳動物の循環系に免疫反応を起させないでしかもその生理活性部分を維持するように変性された

① 日本国特許庁

# 公開特許公報

⑪特開昭 50-42087

⑬公開日 昭50.(1975) 4.16

⑭特願昭 49-83733

⑮出願日 昭49(1974) 7.20

審査請求 未請求 (全10頁)

庁内整理番号

7048 49

6224 44

⑫日本分類

362C05

30 A5

⑬Int. Cl<sup>2</sup>

C07G 7/024

A61K 37/48

A61K 37/26

酵素類およびインシュリンの製造法に関するものである。

ポリペプチド類を特殊な生理的反応をおこさせる目的で循環系に用いられることは医薬技術においてよく知られている。この目的に用いられるポリペプチド類で最もよく知られているのは糖尿病の治療に用いられるインシュリンである。大きな治療ポテンシャルを与える他のポリペプチド類は、いかなる種類の酵素類である。ポリペプチド類特に酵素類を治療に用いることが厳密に制限される主要因は、これらの化合物の殆んどが循環系に免疫反応を引きおこすことである。この反応はポリペプチド類を注射された循環系がポリペプチド類に対して抗体をつくることである。このことは2つの二次的結果の1つまたは双方をおこさせる。最初は抗体によりポリペプチドの破壊が行われることであり、次はより重大なアレルギー反応があらわれることである。

抗体によるポリペプチドの破壊は人間の循環系におけるインシュリンの存在時間が少いから起る

と信じられ、糖尿病に苦しむ人々は新しいインシュリンの投与をかなりたびたび注射されることを余儀なくされている。酵素の場合には問題はポリペプチドの破壊とその結果の生理的活性の否定だけでなく最も望ましくないアレルギー反応の誘発にある。

もしポリペプチド類が望ましい生理的活性を全部または少くとも本質的な部分を保持し、同時に免疫反応を循環系内におこさないように変性されることが見出されたならば、これらの最も価値ある化合物を哺乳動物の循環系に、前記のような不利益がなくてしかもこれまで可能であつたよりもずっと少量に用いることができたのである。

上記で説明した問題はよく認識され、それらを解決する目的で種々検討がなされている。酵素を不溶性支持物に付することが多くの研究の主題であつた。この問題を取扱った評論がシルマン (Silman) およびカチャルスキー (Katchalski)、アニュアル・レビュー・オブ・バイオケミストリー (Ann. Rev. Biochem.)、第 35 巻、第 873 頁、

(3)

ジャーナル・オブ・フィジオロジー・アンド・ファーマコロジー (Can. J. Physiol. Pharmacol.)、第 45 巻、第 705 頁 (1967 年) で論議されている。さらにその他の試みとしてはトリプシンのような酵素にカルボキシメチルセルロースを付けることによる熱安定性 [ミッツ (Mitz) およびサマリア (Summaria)、ネイチャー (Nature)、第 189 巻、第 576 頁 (1961 年)] および親水性担体へのプロテアーゼの付着 [ブルマー (Brummer) ら、ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Eur. J. Biochem.)、第 25 巻、第 129 頁 (1972 年)] がある。しかしながらこれらの試みは注射および注射量の調整に最も望ましい溶解性剤形のポリペプチド類を提供してはいない。さらに他の試みとして合成重合体をポリペプチド性タンパク質に付着させている。この研究の論評がセラ (Sela) 著、"アドバンシズ・イン・イムノロジー" (Advances in Immunology)、第 5 巻、第 30 頁 (1966 年)、ニューヨーク、アカデミック・プレス (Academic

(5)

特開 昭50-42087(2)  
(1966 年)、およびゴールドシュタイン (Goldstein) 著、"フエメンテーション・アドバンシズ" (Fermentation Advances)、ニューヨーク、アカデミック・プレス社 (Academic Press, New York) 1969 年発行、第 391 頁に見出される。しかしながらこの取り上げ方は学問的な興味であつて注射のできる長寿命のポリペプチド類を与えてはいない。生体内寿命の長いポリペプチド類を提供するために行われたもう一つの試みは酵素のマイクロカプセル化であつてチャン (Chang) およびその協力者らによる多数の論文即ち、サイエンス (Science)、第 146 巻、第 524 頁 (1964 年)；トランスアクションズ・オブ・ジ・アメリカン・ソサイエティ (Trans. Am. Soc.)、第 12 巻、第 13 頁 (1966 年)；ネイチャー (Nature)、第 218 巻、第 243 頁 (1968 年)；カナディアン・ジャーナル・オブ・フィジオロジー・アンド・ファーマコロジー (Can. J. Physiol. Pharmacol.)、第 47 巻、第 1043 頁 (1969 年)；カナディアン・ジ

(4)

Press)、に見出される。この研究では、アミノ酸の均質重合体は殆んど全部非免疫性であるが、これらの重合体を免疫性タンパク質に付けると免疫活性は隠蔽されず試験循環系に抗体が生ずることが示されている。たとえば、ポリグリシンそれ自身は非免疫性であるが、タンパク質に付けた場合その配合されたタンパク質はハプテンになる。同様にデキストランはそれ自身僅かに免疫性であるが、インシュリンにカップルされるとインシュリン-デキストランカップル物質は本質的に免疫性になると信じられている。

本発明方法によれば本質的に非免疫性であり、もとのポリペプチドの望ましい生理活性の本質的部分を保持している、重合体にカップルされたポリペプチド類が得られる。

本発明方法においては本質的に直鎖重合体が、その 1 つの末端で適当に末端基を変えるかポリペプチドに相対する活性を持つているカップリング基をそれに付加し、その活性化された重合体をポリペプチドと反応させることにより変性される。

(6)

本発明による保護されたポリペプチド類は水溶液で哺乳動物の循環系あるいは筋肉内に注射することができ免疫反応を本質的に起こさない。

本発明方法により製造される非免疫性ポリペプチド類は、もとのポリペプチド類と同じく投与される。本発明の製品は、生体内に用いる前にポリペプチド含量が標定されるということが理解される。与えられたバッチの力価はこのようにしてわかる。活性物質含量に基づく投与物質の量は従来用いられているのと同じである（即ち従来のインシュリンの投与量が50 i.u.である場合は、インシュリン含量が50 i.u.であるカップルされたインシュリンが投与される）。しかしながら、系中に物質が残存するために、カップルされない物質が用いられる度数の1/2から1/4に投与される（即ちインシュリンそれ自体が6時間間隔で投与される場合は、カップルされた物質は12～24時間間隔で投与することをすすめる）。

本発明方法で保護目的に用いられる重合体は本質的に鎖状エーテルまたは炭素-炭素主鎖を有し

(7)

っている。重合体をポリペプチドにカップルするカップリング剤を選択する場合、これらの特に活性な部分に対して親和力を持つていないカップリング剤を用いることが望ましい。これは望ましいゴールであるから、必ずしも絶対的にそのようになるとは限らない。それ故個々の場合に妥協、言いかえればある本質的な量の非免疫性を与えるためにある量の活性維持を犠牲にする必要がある。得られる最終結果は、用いたカップリング剤によるばかりでなく、反応剤の割合と重合体の分子量にもよる。しかし、ポリペプチドのモル当り10～100、適当なのは15～50モルの重合体が殆んどポリペプチド類に実際に用いられることを見出した。このような割合に用いることによつて少なくとも15%の生理活性が保持されることを見出した。本発明の範囲はこれに限定されるものではないが、一般に少なくとも40%の生理活性が保存される条件を与えることが好ましい。

本発明方法は一般にポリペプチド類に適用されるが、酵素類およびインシュリンに対する適用が

(9)

特開 昭50-42087(3)

ている。枝分れした重合体を用いると免疫反応を発生する物質が生ずることを見出した。しかも主鎖への置換はある量だけが許される。たとえば主鎖に置換されるのはヒドロキシ基、アルキル基またはアルコキシ基、ただしそのアルキルまたはアルコキシは炭素数が5より少い、好ましくは2またはそれより少い基である。選ばれる重合体はポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールおよびポリビニルアルコールであつて、これらのうちポリエチレングリコールが特に好ましい。

また500～5,000ドルトン(dalton)の鎖の長さの範囲の重合体を用いることが好ましく、約750～2,000ドルトンが特に好ましい。

重合体をポリペプチドとカップリングするいくつかの方法が用いられ、以下にさらに詳しく述べる。しかしながら望ましい生理作用を有するそれぞれのポリペプチドの部分は、ポリペプチドによつて変るということに留意しなければならない。たとえばある酵素では1つまたは2つのアミノ酸残基がもつばらこの望ましい生理活性の原因とな

(8)

特に興味がある。用いられる酵素の部類は：酸化還元酵素たとえば：尿酸塩：酸素酸化還元酵素(1.7.3.3；“ウリカーゼ”)；過酸化水素：過酸化水素酸化還元酵素(1.1.1.6；“カタラーゼ”)；コレステロール、還元-NADP：酸素酸化還元酵素(2.0-β-ヒドロキシ化)(1.1.4.1.9；“コレステロール20-ヒドロキシラーゼ”)。

トランスフェラーゼたとえば：UDPグルクロン酸塩グルクロニルトランスフェラーゼ(受体非特異的)(2.4.1.17；“UDPグルクロニルトランスフェラーゼ”)；UDPグルコース：α-D-ガラクトース-1-ホスフェートウリジリルトランスフェラーゼ(2.7.7.12)。

ヒドロラーゼたとえば：ムコペプチドN-アセチルムラミルヒドロラーゼ(3.2.1.17；リゾチム)；トリプシン(3.4.4.4)；L-アスパラギンアミノヒドロラーゼ(3.5.1.1；“アスパラギナーゼ”)。

リアーゼたとえば：フルクトース-1,6-ジホス

(10)

フェート D-グリセルアルデヒド-3-リン酸塩-リアーゼ (4.1.2.12 ; "アルドラーゼ")。イソメラゼたとえば : D-キシロースケトール-イソメラゼ (5.3.1.5 ; キシロースイソメラゼ)。およびリガーゼたとえば : L-シトルリン : L-アスパルテートリガーゼ (AMP) (6.3.4.5)。

が挙げられる。

本発明方法による製品の非免疫性は、標準免疫学的手法により証明される。たとえば、保護されないポリペプチドを試験動物に注射し、生成した抗血清を保護されたポリペプチドに対して、ゲル拡散、補体結合のような手法により抗原反応を試験する。保護されたポリペプチドの皮内注射も直接のまたは遅延した過感作性を示さなかった。反対に、試験動物が保護されたポリペプチドを注射された場合、試験動物から得られた "抗血清" はゲル拡散試験または補体結合試験で反応を示さず、保護されないポリペプチドを注射すると直接または遅延タイプの過感作性反応を示さなかった。

#### (11)

体を適当にはセファデックス (Sephadex) G-50 (商品名) のようなゲル透過樹脂と接触させて除き、保護されたポリペプチドを除き普通の方法で精製する。これらの製品はポリペプチドと考えられるから、精製操作中それらに変質しないように注意しなければならない。それ故、それらを緩衝液中に置いておくか、もし必須とみられる場合は固体の状態で単離することが望ましく、そのような単離は凍結乾燥のようなよく知られた方法によつて行われる。

他の適当な末端基の 1 つはアシルアジド末端基である。その製造には、重合体の末端ヒドロキシルをクロル無水酢酸次いでジアゾメタンと反応させカルボメトキシエーテルのメナルエステルを得る。ヒドラジンで処理し相当するヒドラジドを得、亜硝酸で処理し目的のアシルアジドを得る。

スクシネート基もまたカップリング部分として用いられる。この変性においてはグリコール、たとえば PEG または PPG を炭酸水素ナトリウムのような緩やかな塩基の存在下適当な不活性反応溶

#### (13)

特開 昭50-42087(4)

これまで述べたように保護する方法は 2 つの部類に入る。1 つはカップリング基を重合体の末端基に付加することであり、他の好ましい方法は末端炭素原子にある基、たとえばヒドロキシ基をアミノ基に変換し、そのアミノ基を次いでこの目的のための技術で知られているカップリング剤を用いて変性することである。

はじめの部類では適当なカップリング基として塩化またはフッ化シアヌルが挙げられる。この方法ではポリエチレングリコール (以下 PEG という) を適当な不活性反応溶媒たとえば炭化水素溶媒、適当なのは炭酸ナトリウムのような弱塩基を少量含む無水ベンゼンに取り、それに塩化シアヌルを加える。反応混合物を水で弱め、不溶物を除き、次いで溶媒を適当には減圧下で除き 2-PEG-4-ヒドロキシ-6-クロル-1,3,5-トリアジンを得る。

このようにして製造された活性化された重合体は、次いでポリペプチドの適当な緩衝溶液と反応させる。反応完結後、未反応の活性化された重合

#### (12)

媒に取り、ジフルオロ無水コハク酸のようなジハロ無水コハク酸で処理する。かくして製造された PEG-ジハロスクシネートは次にポリペプチドとの反応に用いられる。

アントラニレート部分もまた用いられる。この変性においてはグリコールをまた不活性反応溶媒に取り、無水イサト酸で処理してアントラニレートエステルを得、精製せずに次の段階のジアゾ化に用いられる。ジアゾ化は普通の方法、たとえばアントラニレートエステルを水に取り、溶液を適当なのは氷酢酸で酸性にし、冷却し、亜硝酸ナトリウムをそれに加える。生成したジアゾニウム塩はポリペプチド類との反応に用いられる。

アジド基を用いる他の興味ある変性方法はアジドカップリング基を光化学的に付けることである。たとえば、緩衝液中のグリコールを 4-フルオロ-3-ニトロフェニルアジドで処理し、未反応のアジドを適当なのは透析によつて除く。

問題の酵素、たとえばリゾチームを水に取り、反応剤で処理し、次いで適当なのは減圧下で照射

#### (14)

し、たとえば PEG-2-ニトロフェニル-リゾチームを得る。

これまでの説明で、カップリング部分が付く重合体の炭素原子は末端ヒドロキシ基を持った炭素原子である。PEG および PEG の場合は問題はおこらないが、PVA の場合はポテンシャル問題がある。PVA は第二級（主鎖）ヒドロキシルおよび第一級（末端）ヒドロキシルを持っていることが注目される。第一級のヒドロキシルの反応性は本質的に第二級のヒドロキシルのそれよりも大である。それ故活性化すると例えば塩化シアヌルとの反応が過剰の重合体の存在で行われると、反応の殆んどは末端ヒドロキシルで行われる。これは望ましいことである。しかし、もし主鎖反応を望むならば用いる活性剤（たとえば塩化シアヌル）の量を上げて行うことができる。第一級と第二級反応の実際の比率は勿論他の反応条件と同様に決定される。

また、末端ヒドロキシ基はアミノ基に変え得る。この方法では重合体をその末端ヒドロキシル基に

(15)

N-PEG-マレイミドを所望のポリペプチドと反応させる。

以下接尾の数字（たとえば PEG 750）は問題の重合体のドルトン分子量を示す。

#### 実施例 1.

尿酸塩：酸素酸化還元酵素（ウリカーゼ）（1.7.3.3）-PEG-カルボメチル配合体。

##### a) PEG の製造。

##### i) PEG-メチルカルボメトキシエステルの製造。

PEG 750 (2.0 g) を液体アンモニア (30 ml) に溶解し、青色が 5 分間持続するまでナトリウムで処理する。アンモニアを乾燥窒素気流上で蒸発させる。残渣をメチルクロルアセテート (5 ml) で処理し、混合物を室温に一夜放置し、最後に 100℃ に 1 時間加熱する。過剰の反応剤を減圧下に除き、PEG-メチルカルボメトキシエステルを得る。

##### ii) PEG-メトキシカルボヒドラジドの製造。

PEG-メチルカルボメトキシエステル (2.0

(17)

トルエンスルホニルクロリドのようなスルホン化剤を反応させるか、四塩化炭素中トリフェニルホスフィンまたはトリフェニルホスフィンおよび適当な N-ハロスクシミドのようなハロゲン化剤を反応させる。このようにして製造されたハロゲン化物またはトシレートは次いでナトリウムアジドで処理しリチウムアルミニウムヒドリドで還元して相当する末端アミノ化合物を得る。

末端アミノ基を持つ重合体は次にこの技術でよく知られている方法を用いてポリペプチドのカルボキシ基とカップルする。1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリノエチル)カルボジイミド、メト- $\rho$ -トルエンスルホネートのような水溶性カルボジイミドを用いることが特に好ましい。このようにして重合体の窒素と酵素の適当なカルボニル基とからなるアミド結合がつくられる。

アミノ基を直接カップリングしてポリペプチドとアミド結合をつくる代りに、カップリングはマレイミド基を経て行われる。この変性では  $\omega$ -アミノ PEG を無水マレイン酸と反応させ、できた

(16)

g)、メタノール (300 ml) およびヒドラジンヒドレート (15 ml) を一夜還流し、減圧下蒸発して PEG-メトキシカルボヒドラジドを得る。

##### ii) PEG-カルボメチルアジドの製造。

上記ヒドラジド (1.0 g) を 2% 塩酸 (150 ml) に溶解し、5% 亜硝酸ナトリウム溶液 (9 ml) を徐々に攪拌しながら加え、20 分間室温に放置し PEG-カルボキシメチルアジドの溶液を得、これはカップリング段階で用いる。

##### b) 尿酸塩のカップリング：酸素酸化還元酵素と PEG-カルボキシメチルアジド

アジドを含む溶液 (16 ml, ii) で作られたもの) をリン酸ナトリウムを加えて pH 8.7 に調整し、ウリカーゼ (25 mg) を加えて室温で 2 時間攪拌し、透析し、変性された酵素をセファデックス G-50 でクロマトグラフィーして単離する。所望ならば凍結乾燥して乾燥状態に保護された酵素を得る。

上記方法により、ウリカーゼの代りにアスパラギナーゼを用い、相当する PEG-アスパラギナ

(18)

ーゼ配合体を得る。同様に、PEGの代りにPPGを用い、相当するPPG-ウリカーゼおよびアスパラギナーゼ配合体が得られる。

#### 実施例 2.

過酸化水素：過酸化水素酸化還元酵素（1.1 1.6；“カタラーゼ”）-2-PEG-4-ヒドロキシ-1,3,5-トリアジン-6-イル配合体。

##### a) PEG-4-ヒドロキシ-6-クロル-1,3,5-トリアジンの製造

PEG 750（30 g., 0.04 モル）またはPEG 2,000（80 g., 0.04 モル）を8 gのNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>を含む150 ml.の無水ベンゼンに溶解し、10℃に冷却し、塩化シアヌル（7.38 g., 0.04 モル）を加え10℃で一夜攪拌する。水（5ml.）を加え、数時間室温に置き、次いで40℃に一夜加熱する。不溶物を遠心分離して除き、溶媒をロータリエバポレータで減圧下40℃でなく。時々濃縮中にあらわれる少量の沈澱物を、少量のベンゼンを加えて粘度を低くし遠心分離し再び濃縮して除く。40℃でビスコース液体であるPEG-

(19)

れる。

#### 実施例 3.

コレステロール，還元された-NADP：酸素酸化還元酵素（20-β-ヒドロキシ化された）（1.1 4.1.9；コレステロール20-ヒドロキシラーゼ）-N-PEG-マレイミド配合体。

##### a) N-PEG-マレイミドの生成。

無水マレイン酸（1.0 g., 1/100 モル）、ベンゼン（50 ml.）およびω-アミノ-PEG（1/200 モル）を2時間還流し、減圧下蒸発し、乾燥窒素気流中2時間200℃に加熱する。

##### b) N-PEGマレイミドとコレステロール20-ヒドロキシラーゼの反応。

酵素（25 mg.）をN-PEG-マレイミド（70 mg.）の0.1 Mリン酸塩緩衝液（pH 7.0，10ml.）溶液に加え、室温に1時間放置し、透析し、目的物を透析物からセファデックスG-50でクロマトグラフィーによつて単離し酵素-PEG配合体の溶液を得、所望ならば凍結乾燥する。

#### 実施例 4.

(21)

特開 昭50-42087(6)

4-ヒドロキシ-6-クロル-1,3,5-トリアジンを冷凍室に貯える。

##### b) PEG-HTA-カタラーゼ配合体の製造。

カタラーゼ（60 ml.;  $8.7 \times 10^{-7}$  モル）を3 ml.の0.05 M硼酸塩緩衝液、pH 9.0に溶解し、PEG 750（470 mg.）を加える。3時間後水酸化ナトリウムでpHを9.0に調整し、室温に一夜放置し、pHを再び9.0に調整する。未反応のPEGをセファデックスG-50のカラムを通して除く。PEG-HTA-カタラーゼ配合体をロータリエバポレータで1 mg.プロテイン/ml.に濃縮し冷蔵庫に貯える（HTA = 4-ヒドロキシ-1,3,5-トリアジン-6-イル）。

上記方法により、カーボワックス2000を用いて同様なカップルされたものが得られる。同様に上記方法によつて、カタラーゼの代りにD-キシロースケトールイソメラーゼ（キシロースイソメラーゼ）またはインシュリンが用いられ、相当するPEG-HTA-キシロースイソメラーゼおよびPEG-HTA-インシュリン配合体が得ら

(20)

UDP グルクロネートグリクロニルトランスフェラーゼ（受容体非特異的の）（2.4.1.17；

“UDP グリクロニルトランスフェラーゼ”）-PEG-コハク酸塩配合体。

##### a) PEG-ジプロモスクシネートの製造。

PEG（1.0 g.）を炭酸水素ナトリウム（1.0 g.）を含む乾燥ベンゼン（10 ml.）に溶解する。ジプロモ無水コハク酸（0.5 g.）を加え、一夜攪拌し、濾過し、濾液を減圧下濃縮しPEG-ジプロモスクシネートを得る。

上記方法により、ジプロモ無水コハク酸の代りにジイオド無水コハク酸を用い、対応するPEG-ジイオドスクシネートを得る。

##### b) UDP グルクロニルトランスフェラーゼ-PEG スクシネート。

緩衝液（10 ml., pH 7.0）中の酵素（50 mg.）を徐々にPEG-ジプロモスクシネート（100 mg.）の水（5 ml.）溶液と室温で処理し、pHを7～8に保つ。目的のPEG-酵素配合体をセファデックス50でクロマトグラフィーによつて単離

-648-

(22)

する。所望ならば製品は凍結乾燥によつて単離される。

#### 実施例 5.

UDP グルコース： $\alpha$ -D-ガラクトース-1-ホスフェートウリジリルトランスフェラーゼ (2.7.7.12) - PEG-アントラニレート配合体。

##### a) PEG アントラニレートエステル製造。

PEG (1.0 g) を炭酸水素ナトリウム (1.0 g) を含む乾燥ベンゼン (10 ml) に溶解し、無水イサト酸 (0.25 g) を加え一夜撹拌する。溶液を濾過し、濾液を40℃で減圧下蒸発しPEG-アントラニレートエステルを得、これは精製せずして次の段階に用いる。

##### i) PEG アントラニレートエステルジアゾニウム塩の製造。

上記で作られたPEG-アントラニレートエステルを水 (5.0 ml) に溶解し、氷酢酸 (0.5 ml) を加え、0-2℃に冷却し、重硝酸ナトリウムの濃厚液を撹拌下滴加する。重硝酸ナトリウムの滴加は重硝酸が生成したときに止める。

(23)

濾過する。濾液を水で透析し、濾過し凍結乾燥する。

##### b) リゾチウムと4-アジド-2-ニトロフェニルPEGの光化学結合。

リゾチウム (60 mg) を3 ml の水に溶解し4-アジド-2-ニトロフェニルPEG (50 mg) を加える。その溶液を40℃で18時間重硝酸ナトリウム溶液に浸した (400 nm より短い波長の放射を除くために) 2つの125 W タングステン電球で照射した。生成物をセファデックスG-50でクロマトグラフィーして精製し溶出してPEG-2-ニトロフェニル-リゾチウム配合体を得た。所望ならば凍結乾燥によつて固体の配合体を単離する。

#### 実施例 7.

##### トリプシン-PEG アミド配合体。

$\omega$ -アミノ-PEG (実施例9参照) (100 mg) を緩衝液 (10 ml, pH 6.0) に溶解し、トリプシン (50 mg) を加え、次いでエチルジメチルアミノプロピルカルボジイミド (200 mg) を加

(25)

##### b) UDP グルコースのカップリング： $\alpha$ -D-ガラクトース-1-ホスフェートウリジリルトランスフェラーゼとPEG-アントラニレートエステルジアゾニウム塩。

酵素 (25 mg) を緩衝液 (5 ml, pH 7-7.5) に溶解し0-2℃に冷却し、これを上記製造されたジアゾ化溶液に滴加する。pH を7-7.5に保つ。2時間後、溶液を室温にもどし、濾過し、目的化合物をセファデックスクロマトグラフィーによつて単離する。所望ならば配合体を凍結乾燥によつて固体の形で単離する。

#### 実施例 6.

ムコペプチドN-アセチルムラミルヒドロラーゼ (3.2.1.17) - 4-アジド-2-ニトロフェニルPEG。

##### a) 4-アジド-2-ニトロフェニルPEG。

PEG (1.0 g) を硼酸塩緩衝液, pH 9.8 (100 ml) に溶解し、アセトン (10 ml) 中の4-フルオロ-3-ニトロフェニルアジド (1.0 g) で処理する。反応混合物を一夜40℃で撹拌し

(24)

える。pH を6に保ち、1時間後過剰の酢酸塩緩衝液、pH 6を加えて反応を止める。配合体をセファデックスG-50でクロマトグラフィーし単離する。

上記方法により、トリプシンの代りにL-シトルリン-L-アスパルテートリガーゼ (AMP) を用いL-シトルリン-L-アスパルテートリガーゼ (AMP) (6.3.4.5) - PEG アミド配合体を得る。

#### 実施例 8.

##### $\omega$ -アミノPEGの製造。

##### a) 方法(i)トシル化。

PEG (分子量6000) (50 g) をトルエン (400 ml) に溶解し、トルエン (60 ml) を混合物から蒸留し水分の痕跡を除き、冷却して無水トリエチルアミン (5.5 ml) を加え、次いでp-トルエンスルホニルクロリド (3.4 g) を加える。一夜室温に保ち、濾過する。濾液を5℃に冷却し沈澱を集める。この重合体を無水エタノール (200 ml) に溶解しナトリウムアジド (1.0 g

(26)

を加え、還流下36時間煮沸しPEG $\omega$ -アジドを得る。

#### 方法(II)ハロゲン化。

P-トリエンシルホニルクロリドの代りにチオニルブロミド(2.5 ml.)を用いるほかは上記PEG-トリレートが操作が使われる。溶液はチオニルブロミドでPEG- $\omega$ -ブロミドを得た後15分間還流し、順次同様にPEG- $\omega$ -アジ化物に変換される。

#### b) $\omega$ -アミノPEGへの変換。

$\omega$ -アジドPEGのエタノール性溶液にアダムス触媒を加え、もはや吸収されなくなるまで水素で処理し、減過し減圧下少量に濃縮する。乾燥エーテル(150 ml.)を加え重合体を3℃で一晩沈澱させ、濾過して集める。

#### 実施例 9.

フルクトース-1,6-ジホスフェート D-グリセルアルデヒド-3-ホスフェート リアーゼ (4.1.2.12; "アルドラーゼ")-PEGアミド。

(27)

ml.)を加え、次いで数時間室温に保ち一夜40℃に加熱する。不溶物を遠心分離して除き、溶媒をロータリエバポレータで減圧下40℃で除く。濃縮中時々出てくる少量の結晶を少量のベンゼンを加えて低粘度とし、遠心分離し再び濃縮する。PEG-3-ヒドロキシ-6-クロロ-1,3,5-トリアジン、40℃でビスコース液体を冷凍室に貯える。

#### b) PEG-HTA-インシュリン配合体の製造。

インシュリン10 mg.を1 ml.の0.1 M 硼酸塩緩衝液, pH 9.2に溶解しPEG-HTA 2,000 (179 mg)を加える。2時間後、溶液をセファデックスG-10のカラムを通して未反応のPEGを除き調整する(PEG-HTA-インシュリン配合体をロータリエバポレータで1 mg.タンパク質/ml.に濃縮し冷凍室に貯える。HTA=-4-ヒドロキシ-1,3,5-トリアジン-6-イル)。

上記方法により、PEG-750を用いて同様の製品が得られる。

また上記方法により、反応をpH 8.5および

(29)

特開 昭50-42087(8)

酵素(30 mg)を2 M 酢酸ナトリウム(3 ml.)、

0.1 M グリオキサール酸ナトリウム(1.5 ml.)および10 mM 硫酸銅(1 ml.)に溶解する。0.4 M 酢酸を十分加えpHを5.5にし20℃に1時間保つ。変性されたタンパク質をセファデックスでゲル濾過して単離する。変性されたタンパク質は2 M 酢酸ナトリウム、2 M 酢酸(1 ml.)および $\omega$ -アミノPEG(100 mg)と一夜37℃に保温する。目的物はセファデックスG-50でクロマトグラフィーして単離する。

#### 実施例 10.

インシュリンPEG-4-ヒドロキシ-1,3,5-トリアジン-6-イル配合体。

#### a) PEG-4-ヒドロキシ-6-クロロ-1,3,5-トリアジンの製造。

PEG 750 (30%, 0.04 モル)またはPEG 2,000 (80%, 0.04 モル)を8%のNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>を含んだ150 ml.の無水ベンゼンに溶解し10℃に冷却し塩化シアヌル(7.38%, 0.04 モル)を加え、一夜10℃に攪拌する。水(5

(28)

pH 10で行つて同様の製品が得られる。

#### PEG-カタラーゼの酵素活性

カタラーゼ-ベアス(Beers)およびサイザー(Sizer)、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカルケミストリー(J. Biol. Chem.)、第195巻、第133頁(1952年)の方法で検定した。PEG 750-カタラーゼおよびPEG 2,000-カタラーゼは共に変性されないカタラーゼよりも少し活性であつた。

変性されないカタラーゼ: 41,500 単位/mg. タンパク質

PEG 750-カタラーゼ: 43,750 単位/mg. タンパク質

PEG 2,000-カタラーゼ: 43,500 単位/mg. タンパク質

未変性およびPEG 750-カタラーゼの熱安定性は37℃および60℃で同様であつた。

#### PEG-カタラーゼの抗原的試験

免疫 — ニュージーランド産白色生育雌ウサギを1.5 mg/ml.の貯蔵されたウシの肝臓カタラーゼで4週間、全量5.5 mgのカタラーゼが投与されるように静脈を通じ免疫した。ウサギは免疫計画完了後7および14日心臓穿刺して飼育した。約1

(30)



ヶ月後ウサギに 5 mg. の適当な抗原を注射し、2 回目の増強注射後 1 週間心臓穿刺して飼育した。

#### 生体内および試験管内試験

最後の飼育後 — ウサギの背部を電気バリカンで剃り、残った柔毛を脱毛剤でさらに除いた。翌日ウサギに 0.1 ml. の適当な抗原および碳酸塩 - 緩衝液食塩水（希釈剤）を皮内注射し、直接および／または遅延タイプの過敏作性を試験した。すべての動物は注射後 96 時間皮膚反応が観察された。

最初のまたは 2 回目の免疫後得られたウサギの抗血清を試験管内で沈澱 (1) および補体結合活性 (2, 3) を検定した。各抗血清（非希釈、1/10, 1/50）をカタラーゼおよび PEG-HTA - カタラーゼ溶液（濃度は 1000 r/ml. ~ 5 r/ml.）の両方に対してゲル拡散盤（1.0% のアジドを保存剤として加えた生理的食塩水中の 1.0% ノーブル・アガール (Noble Agar)）に固定した。盤を室温に 48 時間ついで 4℃ で 3 ~ 4 日保温した。抗血清を吸収した加熱不活性ヒツジの赤血球

(31)

自然のカタラーゼに対して試験した場合、補体 - 結合活性は陽性であつた。変性されたカタラーゼを反応抗原として用いた場合、結果は陰性であつた。

#### PEG - インシュリン免疫検定

PEG-HTA - インシュリンを実施例 2 に従つて製造し、抗原活性を次の方法によつて試験した。

試 料	(1) インシュリン 活性 μ 単位/ml. (動物検定)	(2) インシュリン 抗体活性 μ 単位/ml. (放射免疫検定)
未変性 インシュリン	137	127
PEG-HTA (750) インシュリン	72*	0
PEG-HTA (2,000) インシュリン	90*	0

\*これらの数字は希釈数として得られたもので実際の検定値ではない。

(33)

特開 昭50-42087 (9)  
の補体結合活性をバージニア州アレキサンドリア市、クック・エンジニアリング社 (Cooke Engineering Co., Alexandria, Virginia) 製のマイクロタイター・コンプレメント・フィクセーション・テスト (Microtiter Complement-Fixation test) を用いて測定した。抗血清はカタラーゼおよび PEG-HTA - カタラーゼ希釈度 1000 r/ml. ~ 15 r/ml. に対して 1:1 および 1:10 の希釈度であつた。盤は 37℃ に 30 分間保温後溶血反応の存在および不存在を示した。

#### カタラーゼの静脈内免疫

##### a) カタラーゼ免疫後のウサギ抗血清の分析

ゲル拡散 — 試験された非希釈および 1/10 抗血清はカタラーゼに対する抗体沈澱は陽性であつた。重要なことに、この自然の酵素に対して作られた抗血清をポリオキシエチレン残基によつて変性された酵素に対して試験した場合、交叉反応の証拠は全くなかつた。

補体結合 — 最初および 2 回目増強の血清は

(32)

上記結果は PEG-HTA - インシュリンはインシュリン抗血清に相対して抗原的活性を有しないことを示す。

#### PEG-HTA - インシュリン検定

あらかじめインシュリンおよび同量のインシュリンを含む PEG-HTA - インシュリンを試験ウサギに注射し、血糖レベルをニュージャージー州フリーホールド市、ワーシントン・バイオケミカル社 (Worthington Biochemical Corporation, Freehold, N.J.) 製 "グルコスタット" (Glucostat) 法で測定した。

3 時間後		血中のグルコースレベル
PEG-HTA	インシュリン	正常の 50%
	インシュリン	正常の 20%

これらの試験は PEG-HTA - インシュリンは投与した配合インシュリンの重量に対してインシュリンの約 50% のインシュリン活性を有することを示す。

#### PEG インシュリンラット検定

標準実験室ラット (220/225 g.) をゴー

(34)

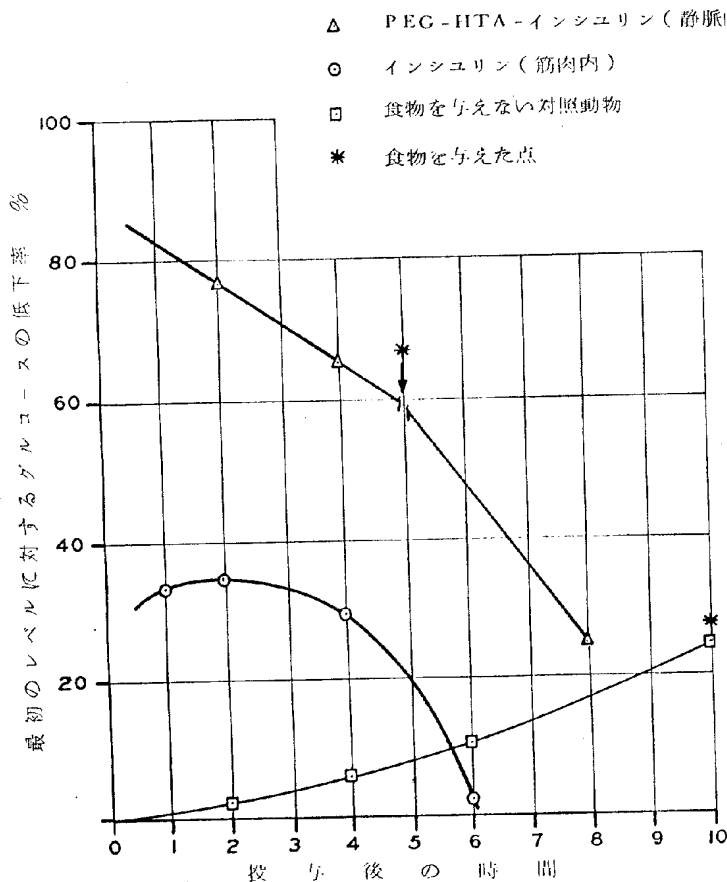
ルドナー (Goldner)、ビューレチン・オブ・ザ  
・ニューヨーク・アカデミー・オブ・メディシン  
(Bull. N. Y. Acad. Med.) 第 21 巻、第 44 頁、  
1945 年、の方法によりアロキサン注射を用い  
て糖尿病にした。試験期間中試験動物には食物を  
与えなかった。インシュリンおよび PEG 2000  
-HTA 組成物を pH 9.2 および 10.5 で製造し、  
試験ラットに投与した。pH 10.5 の製品は血中  
グルコースレベルの低下を示さなかった。

結果は下表および図面に要約したとおりである。

インシュリン (筋肉内)

時 間	血中グルコ ースレベル (mg/100ml)	最初のレベル からの低下 (mg/100ml)	対 照 からの 低下%
0	410	---	---
1	275	135	32.9
2	270	140	34.1
4	290	120	29.2
6	400	10	02.4

(35)



特開 昭50-42087(10)

対 照 (試験期間中食物を与えない)

0	520	0	0
2	510	10	1.9
4	490	30	5.7
6	470	50	9.6
10	395	125	24.0

PEG HTA インシュリン (pH 9.2) (静脈内)

0	305	---	---
2	72.5	232.5	76.2
4	101.5	203.5	66.7
5	---	---	---
8	230	75	24.6

\* この点以後は動物に食物を与えた。

4. 図面の簡単な説明

図は PEG インシュリンラット検定の結果を  
示したものである。

特許出願人 リサーチ・コーポレーション

代 理 入 弁理士 青 山 稔 ほか 1 名



(36)

5. 添附書類の目録

- |                            |     |
|----------------------------|-----|
| (1) 明 細 書                  | 1 通 |
| (2) 図 面                    | 1 通 |
| (3) 委 任 状 並びに法人国籍証明書 (訳文付) | 1 通 |
| (4) 願 書 副 本                | 1 通 |
| (5) 優先権証明書 (訳文付)           | 1 通 |

6. 前記以外の発明者および代理人

(1) 発明者  
住所 アメリカ合衆国ニュージャージー州 08854  
ピスカタウェイ市オーバーブルックロード 313 番地

氏名 セオドラス・フアン エス

住所 アメリカ合衆国ニュージャージー州 08805  
パウンドブルック市ウエストフランクリンストリート  
45 番地

氏名 ニコラス・シー・パルツック

(2) 代理人 〒541

住所 大阪府大阪市東区本町2-10 本町ビル内

電話 大阪 (06) 262-5521

氏名 弁理士 (6852) 田 村 恭 生

